銅含有酵素におけるマルチ銅センターの構造・機能相関

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 櫻井, 武, Sakurai, Takeshi メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00034781

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.

銅含有酵素におけるマルチ銅センターの構造・機能相関

（１３４４０１９４）

平成１３年度～平成１５年度科学研究費補助金
（基盤研究(B)(2)）研究成果報告書

平成１６年３月

櫻　井　　武
（金沢大学理学部化学科）

マルチ銅オキシダーゼは一個のタイプ１銅，一個のタイプ２銅，一対のタイプ３銅からなる活性中心を有する銅含有酵素に対する総称である。19 世紀の末にウルシの樹液を固化させる成分としてラッカーゼが発見されたが，銅イオンが必須であることが確立され，そのキャラクタリゼーションが本格的に行われるようになったのは 1970 年代に入ってからのことである。マルチ銅オキシダーゼとしてはウルシラッカーゼの他に，菌類のラッカーゼ，アスコルビン酸オキシダーゼ，セルロプラスミンなどがよく知られているが，最近では，ビリルビンオキシダーゼ，Fet3p，CueO，CotA，PcoA など新発見が相次いでおり，微生物からほ乳度物に至る広い範囲で存在する極めて一般性の高い酵素であることがわかりつつある。基質特異性は多様であり，タイプ１銅よりも酸化還元電位が負側にある物質は基質となりうるが，多くの場合様々のフェノール性化合物，Fe(II)，Cu(I)，アスコルビン酸などは良好な基質となりうる。マルチ銅オキシダーゼは工業および医薬分野で大変有用であり，ビリルビンオキシダーゼとアスコルビン酸オキシダーゼは臨床検査に利用されている。菌類のラッカーゼはデニム地の脱色に利用されている。また，マルチ銅オキシダーゼはパルプの製造や色素の形成において有力な酵素と考えられており，実用化研究も盛んに行われている。さらに，マルチ銅オキシダーゼは基質由来の電子を用いて酸素を水にまで４電子還元することから，生物燃料電池として利用する研究も行われ始めている。

基質は電子伝達のメディエーターとして機能するタイプ１銅付近に結合すると考えられるが，基質結合部位を明らかにし，基質特異性を明らかにすることは今後マルチ銅オキシダーゼ研究の重要なテーマの一つとなるであろう。このためには，天然型酵素と基質の相互作用を解明するとともに，個々のマルチ銅オキシダーゼを異種発現し，変異導入によって基質特異性を解明する必要がある。また，変異導入によって基質特異性をチューニングすることができるようになれば，実用的価値が高まることは言う間でもない。一方，変異導入するによって期待されるのは，反応機構の解明である。本研究によっても，天然型のラッカーゼの反応過程において唯一補足することが出来ていた酸素還元の中間体のさらに前段階に生成しているはずの中間体を，人工混合原子価状態を作成することによって補足することに成功した。しかし，これらの中間体の捕捉を容易にし，キャラクタライズすることによって反応機構を解明するには，適切な変異体を作成するという研究手段が有効であることは言うまでもない。

以上のように基礎研究のみならず応用研究にも対処することを念頭において，まず本研究では，マルチ銅オキシダーゼのプロトタイプであるウルシのラッカーゼの反応中間体を補足してキャラクタライズした。ついで，発見以来約１３０年を要して，ウルシラ

ッカーゼのアミノ酸配列を初めて決定することに成功した。そして，この植物酵素を微生物の宿主を用いて異種発現させることを目的として検討し，最終段階までこぎ着けた。一方，*Myothecium verrucaria* のビリルビンオキシダーゼの反応機構を検討するためにこれまで利用していた *Aspergillus oryzae* を宿主とする発現系を改良することを計画し，*Pichia pastoris* を宿主とする異種発現系を構築した。この新しい発現系によってビリルビンオキシダーゼを大量発現することが可能となった。組変え体は天然型酵素よりも酵素活性が高く，熱安定性も優れており，実用レベルに達していた。この発現系を用いて，ビリルビンオキシダーゼのタイプ３銅部位とその近傍に位置する触媒残基に変異導入した。これらの変異体を用いた反応機構の解明については緒についたところであり，本研究を契機として今後も引き続き検討していく予定である。また，タイプ１銅にも変異導入し，天然型酵素を用いていては捕捉不可能な酸素還元中間体を検出することができるようになった。さらに，基質結合部位にも変異導入し，基質特異性を改変するという壮大な研究にも着手した。

研究組織

研究代表者：　櫻　井　　武　　（金沢大学理学部教授）

交付決定額（配分額）

（金額：千円）

	直接経費	間接経費
平成13年度	10,900	0
平成14年度	1,500	0
平成15年度	1,800	0
総計	14,200	0

研究発表

(1) 学会誌等

Giorgio Zoppellaro, Takeshi Sakurai, and Hong-wei Huang
A Novel Mixed Valence Form of *Rhus vernicifera* Laccase and its Reaction with Dioxygen to Give a Peroxide Intermediate Bound to the Trinuclear Center
J. Biochem., **129**(5), 949-953 (2001)

Sakurai, Takeshi
Genomic Studies of Lacquer Tree Laccase and Bilirubin Oxidase and Oxygen Reduction
J. Inorg. Biochem., **86**(1), 95 (2001)

Hirotaka Ichiki, Yoko Tanaka, Kiyotaka Mochizuki, Katsuhiro Yoshimatsu, Takeshi Sakurai, and Taketomo Fujiwara
Purification, Characterization, and Genetic Analysis of Cu-Containing Dissimilatory Nitrite Reductase from a Denitrifying Halophilic Archaeon, *Haloarcula mrismortui*
J. Bacteriol., **183**(14), 4149-4156 (2001)

Shinji Kurose, Nobuhiko Sakurai , and Takeshi Sakurai
Perturbation at the High Spin Heme *b* Center in the Membrane-Bound Nitric Oxide Reductase
J. Inorg. Biochem., **83**(4) , 281-286 (2001)

Kazutomo Nitta, Kunishige Kataoka and Takeshi Sakurai
Primary Structure of a Japanese Lacquer Tree Laccase as a Prototype Enzyme of Multicopper Oxidases
J. Inorg. Biochem., **91**(2), 125-131(2002)

Kinishige Kataoka, Mayuko Takata, and Takeshi Sakurai
The Gln95His Mutant of Mavicyanin has a Type-1.5 Copper site
J. Inorg. Biochem., **96**(1), 164 (2003)

Takeshi Sakurai, Lei Zhang, Takahiro Fujita, Kunishige Kataoka, Atsushi Shimizu, Tatsuya Samejima, and Shotaro Yamaguchi
Authentic and Recombinant Bilirubin Oxidases are in Different Resting Forms
Biosci. Biotechnol. Biochem., **67**(5), 1157-1159 (2003)

Atshushi Shimizu, Tstsuya Samejima, Sgun Hirota, Shotaro Yamaguchi, Nobuhiko Sakurai, and Takeshi Sakurai
Type III Cu Mutants of *Myrothecium verrucaria* Biilirubin Oxidase
J. Biochem.,**133**(6), 767-772 (2003)

Sakurai, Takeshi, Kazuhiro Tanaka, Reiko Kitagawa, and Kunishige Kataoka
Construction of a New Expression System of Bilirubin Oxidase and its Mutants to Explore the Dioxygen ReductionMechanism
J. Inorg. Biochem., **96**(1), 223 (2003)

(2) 遺伝子バンクへのデータ登録

T. Sakurai and K.Nitta
cDNA sequence of Japanese Lacquer Tree Laccase 1
AB062449 (2001)

A. Asada, N. Sakurai, A. Moriyama, and T. Sakurai
DNA Sequence of *Halomonas halodenitrificans*Nitrate Reductase Gene Cluster
AB076402 (2001)

T. Sakurai, K. Nitta and K.Kkataoka
cDNA sequence of Japanese Lacquer Tree Laccase 2
AB083127 (2002)

(3) 口 頭・ポスター 発 表

新田一朋，藤田隆弘，清水厚志，鮫島達也，櫻井　武
マルチ銅オキシダーゼの構造遺伝子・活性中心・反応
第12回金属の関与する生体関連反応シンポジウム，2001年5月25日

新田一朋，櫻井　武
うるしラッカーゼおよびマルチ銅オキシダーゼスーパーファミリーの一次構造と酵素機能
日本生化学会北陸支部第19回大会, 2001年5月26日

Takeshi Sakurai
Genomic Studies of Lacquer Tree Laccase and Bilirubin Oxidase and Oxygen Reduction
The 10th International Conference on Bioinorganic Chemistry, 2001年8月26-31日

櫻井　武
膜結合性チトクロム*bc*型NOリダクターゼの構造と機能
第51回錯体化学討論会（シンポジウム），2001年9月28日

藤原健智，吉松勝彦，一木宏隆，岩崎俊雄，櫻井　武

古細菌における硝酸呼吸系金属酵素の生化学的性質
第51回錯体化学討論会（シンポジウム），2001年9月28日

田中和浩，清水厚志，鮫島達也，山口庄太郎，片岡邦重，櫻井　武
ビリルビンオキシダーゼミュータントの性質と反応
第51回錯体化学討論会，2001年9月29日

新田一朋，鈴木健太，片岡邦重，櫻井　武
ウルシラッカーゼの分子構造と活性中心
第51回錯体化学討論会，2001年9月29日

大谷将人，汲田英之，櫻井宣彦，片岡邦重，櫻井　武，小澤智宏，実川浩一郎，増田秀樹
光学活性Ru錯体をプローブとして用いたアズリン活性部位
第51回錯体化学討論会，2001年9月29日

新田一朋，鈴木健太，片岡邦重，櫻井　武
ウルシラッカーゼ遺伝子の全塩基配列決定
第74回日本生化学大会，2001年10月27日

藤田隆弘，田中和浩，清水厚志，鮫島達也，山口庄太郎，片岡邦重，櫻井　武
ビリルビンオキシダーゼの活性中心近傍への変異導入
第74回日本生化学大会，2001年10月27日

新田一朋，鈴木健太，片岡邦重，櫻井　武
ウルシラッカーゼの塩基配列と遺伝子クローニング
日本化学会近畿支部北陸地区講演会，2001年11月10日

藤田隆弘，田中和浩，片岡邦重，櫻井　武
ビリルビンオキシダーゼのミュータントとその性質
日本化学会近畿支部北陸地区講演会，2001年11月10日

菅谷典子，片岡邦重，櫻井　武
一酸化窒素リダクターゼのサブユニットNorC*の発現とその性質
日本化学会近畿支部北陸地区講演会，2001年11月10日

藤田隆弘，清水厚志，鮫島達也，張雷，片岡邦重，櫻井　武
ビリルビンオキシダーゼおよびそのミュータントの性質と酸素還元反応
第12回金属の関与する生体関連反応シンポジウム　–日々の生活と金属–
2002年5月23日

藤田隆弘，田中和浩，張雷，成瀬大作，清水厚志，鮫島達也，山口庄太郎，片岡邦重，Zoppellaro Giorgio，櫻井　武

野生型ビリルビンオキシダーゼと組換え体の性質と反応ならびに活性部位近傍への変異導入
第75回日本生化学会大会　2002年10月17日

菅谷典子，片岡邦重，櫻井　武
一酸化窒素還元酵素(NOR)の NorC サブユニットの発現とそのキャラクタリゼーション
第75回日本生化学会大会，2002年10月17日

櫻井　武
マルチ銅オキシダーゼによる酸素の4電子還元に対する生物無機化学的および分子生物学的アプローチ
日本化学会第82秋期年会（シンポジウム），2002年9月27日

田中和浩，成瀬大作，北川理映子，張雷，片岡邦重，櫻井　武
野生型およびリコンビナントビリルビンオキシダーゼの活性とその性質
第35回酸化反応討論会，2002年11月4日

田中 和浩，片岡邦重，櫻井 武
ビリルビンオキシダーゼの酵母による高発現系の構築
日本化学会近畿支部北陸地区講演会，2002年11月17日

成瀬大作，北川理映子，田中和浩，片岡邦重，櫻井　武
ビリルビンオキシダーゼの変異体の性質と機能
日本化学会近畿支部北陸地区講演会，2002年11月17日

鈴木健太，水上智紀，片岡邦重，櫻井　武
ウルシラッカーゼの遺伝子構造と異種発現の試み
日本化学会近畿支部北陸地区講演会，2002年11月17日

菅谷典子，岩本美絵，中嶋祥子，片岡邦重，櫻井　武
一酸化窒素還元酵素の触媒サブユニットNorCの異種発現とその性質
日本化学会近畿支部北陸地区講演会，2002年11月17日

菅谷典子，片岡邦重，櫻井　武
脱窒菌 *Paracoccus halodenitrificans* の一酸化窒素還元酵素のシトクロム *c* サブユニットの発現とそのキャラクタリゼーション
日本化学会第81春期年会　2002年3月27日

片岡邦重，田中 和浩、北川 理映子、櫻井 武
ビリルビン酸化酵素の酵母による高発現系の構築
日本農芸化学会大会2003，4月2日

北川理映子，田中和浩，片岡邦重，櫻井　武
ビリルビンオキシダーゼの酵母による発現と変異導入
日本生化学会北陸支部21回大会，2003年5月31日

Kinishige Kataoka, Mayuko Takata, and Takeshi Sakurai
The Gln95His Mutant of Mavicyanin has a Type-1.5 Copper site
11th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, 2003年7月20日

Sakurai, Takeshi, Kazuhiro Tanaka, Reiko Kitagawa, and Kunishige Kataoka
Construction of a New Expression System of Bilirubin Oxidase and its Mutants to Explore the Dioxygen ReductionMechanism
11th International cCnference on Biological Inorganic Chemistry, 2003年7月20日

櫻井　武
酸素は微量遷移金属をどのように利用しているか
～マルチメタルセンターを有する酵素の構造と機能～
銅，鉄における遺伝子構造，発現，酵素構造，反応機構およびその応用
第43回生化学若い研究者の会，2003年8月10日

齋藤 大明，杉山 歩，吉本 高志，長尾 秀実，櫻井 武，西川 清
分子動力学法を用いたアズリン蛋白の主鎖局所ダイナミクスの理論的研究
分子構造総合討論会2003，2003年9月24日

高田真由子，片岡邦重，櫻井　武
ブルー銅タンパク質マビシアニンのGln95Hisミュータント
第53回錯体化学討論会，2003年9月24日

田中和浩，北側理映子，成瀬大作，井上めぐみ，片岡邦重，櫻井　武
ビリルビンオキシダーゼの異種発現と酸素4電子還元機構解明を目指したミュータント
第53回錯体化学討論会，2003年9月25日

杉山 歩，齋藤 大明，吉本 高志，長尾 秀実，櫻井 武，西川 清
アズリンの反応活性部位付近におけるラマンスペクトルの理論計算
分子構造総合討論会2003，2003年9月27日

Daisuke Naruse, Megumi Inoue, Kazuhiro Tanaka Kunishuge Kataoka and Takeshi Sakurai
Asp104 Mutants of Bilirubin Oxidase
第76回日本生化学会大会，2003年10月16日

Kazuhuro Taknaka, Reiko Kitagawa, Kunishige Kataoka, and Takeshi Sakurai
Construction and Characterization of Cys457Ser Mutant of Bilirubin Oxidase
第76回日本生化学会大会，2003年10月16日

Mayuko Takata, Kunishige Kataoka, and Takeshi Sakurai
The Gln95His Mutant of Mavicyanin Has a Type-1.5 Copper Site
第76回日本生化学会大会，2003年10月17日

井上めぐみ，片岡邦重，櫻井　武
Asp105変異型ビリルビン酸化酵素のキャラクタリゼーション
日本農芸化学会大会2004，2004年3月28日

研 究 成 果

(1) ウルシラッカーゼに関する研究

A. 酸素還元中間体の捕捉

ウルシラッカーゼの休止体に対する分光学的および磁気的研究は豊富であり，４個の銅イオンのキャラクタリゼーションが行われているが，反応機構に関する研究は数があまり行われておらず，その結果も混乱した状態にあった。本基盤研究に先行する基盤研究(C)(2)マルチ銅オキシダーゼの三核銅クラスターにおける酸素の４電子還元（平成 11～12 年度）において，初めて，中間体を補足することに成功した。この中間体は，一度だけターンオーバーさせた場合に限って補足可能となるものであり，三核銅部位に二つのヒドロキソ基が配位しているか，もしくは電子的に等価なラジカル種であると結論することができた。この中間体の生成には酸素の還元に必要な 4 電子が供給されることが不可欠であるが，その生成過程を追跡したところ，それ以前に存在するはずの反応中間体は捕捉することができないことがわかった。

そこで，１電子欠損した三核銅部位が還元された状態と酸素を反応させることができれば，3 電子還元状態の中間種が捕捉できるものと考え，選択的タイプ２銅除去体に嫌気下で等量の Cu(I)Cl を作用させることによって，タイプ１銅部位が酸化，タイプ 2，3 銅部位が還元された混合原子価状態を作成して酸素と反応させた。340nm に吸収を有する中間体は酸素の４電子還元中間体よりも長い寿命を有していた。pH が低い程，中間体の寿命は短くなるが，pH７以上では数時間観測することができた。4 電子還元中間体と異なり，この３電子還元中間体は ESR 非検出であった。検出当初この中間体はペルオキソ種と考えたが，その後，Cu(II)Cu(II)Cu(III)が２つのオキソ種で架橋したクラスター低分子モデル化合物が類似したスペクトルを示すことから Cu(III)を含む種である可能性も否定できなくなった。この構造であると，既に補足していた４電子還元種へスムーズに移行することができると思われる。しかしながら，この構造については結論に至らなかった。この種の同定を行うために，タイプ 1 銅部位に変異を導入したビリルビンオキシダーゼのミュータントを作成した。

B. 一次構造の決定

天然型酵素を用いている限り，ラッカーゼの反応機構に関してさらに問題の中心部に切り込んでいくことは困難であると思われた。一方，ラッカーゼは 19 世紀末には発見されているにもかかわらず，直接的な構造情報は皆無であった。そこで，cDNA の塩基配列を決定し，ウルシラッカーゼのアミノ酸配列を明らかにした。ウルシラッカーゼには少なくとも３種類のアイゾザイムが存在することを見出したが，このうち２つの全アミノ酸配列を決定し，１方のアイゾザイムの塩基配列は論文として発表した。もう一つのアイゾザイムの塩基配列は未だ，論文として発表していないが，ジーンバンクに登録して一般公開した。後日，遺伝子配列は特許化する価値があることが判明したが，既に公開しているため，特許化は行わずに，次の節に示すようにラッカーゼの異種発現を目指した。遺伝子配列の結果からは，４つの銅イオンの結合部位や，高次構造に関する情報が得られた。また，既に X 線結晶構造解析が行われている他のマルチ銅オキシダーゼの座標データをテンプレートとして高次構造モデルも作成した。基質結合に関する情報も得られているが，将来特許化する際に微妙な問題となるので，ラッカーゼの異種発現を完成させた後に，解析結果を公開する予定である。

C. ウルシラッカーゼの異種発現

いくつかの菌類起源のラッカーゼは異種発現されており，本基盤研究中に外国のグループによって結晶化も行われた。しかしながら植物ラッカーゼに関しては，いまだ異種発現に成功していない。そもそも，アミノ酸配列決定の結果，ウルシのラッカーゼは菌類のラッカーゼとはその相同性が20%以下であることから，植物ラッカーゼと菌類のラッカーゼは別の酵素として区別されるべきものであったにものと思われる。本来の生理的役割も植物ラッカーゼと菌類ラッカーゼは相違しており，当然基質特異性にも大きな相違が見られる。企業との共同研究として，本基盤研究と平行して菌類のラッカーゼを異種発現させたところ，菌類のラッカーゼの発現は３ヶ月程で達成できたが，植物ラッカーゼの発現は 3 年間を要して，ようやく

どの段階がネックとなっているかを洗い出したところである。ウルシラッカーゼの発現については，ごく近い将来の特許化を目指している関係上，中間段階の報告として詳細に言及することは避けたい。

大腸菌を宿主とした場合，封入体として発現したが，アポタンパクの状態であり，可溶化と銅の再構成の条件を検討する必要がある。一方，酵母による発現では，mRNA への転写は行われているが，ウルシと宿主とのコドン使用頻度の相違のために，翻訳過程が阻害されている可能性が高いと考えられたので，この問題を克服するために，人工遺伝子を作成した。目下，この人工ラッカーゼ遺伝子を用いて，研究を続行中である。

(2) ビリルビンオキシダーゼに関する研究

A. *Pichia pastoris* による異種発現

肝機能検査のためのビリルビンオキシダーゼとしては *Myrothecium verrucaria* 起源の野生型酵素が利用されているが，酵素の安定性が低いという問題点を抱えている。また，ビリルビンが生体に存在するいくつかのフォームを特異的に分析するという用途には十分応えきれていない。一方，われわれはこれまで，*Alkaligenes oryzae* を宿主とする異種発現系を用いてビリルビンオキシダーゼの銅結合部位に変異導入して，活性中心のキャラクタリゼーションを行ってきたが，カビを宿主とする方法には様々な不都合な点があった。そこで，本研究では酵母 *Pichia pastoris* を宿主とする異種発現法を開発した。

Pichia pastoris を宿主とする発現によって，次のような改良がなされた。

1 エレクトロプレーションによる形質転換が可能である
2 抗生物質 geneticin(G418)耐性によるスクリーニングが可能である
3 マルチコピー化による高発現が可能となった
4 メタノールによる誘導が可能である
5 シグナルを融合させて培地に分泌することができる

新しい発現系は以上のような特徴を有することから，すぐれた発現系を構築することができた。組換え体は野生型酵素よりも安定性が高く，ビリル

ビンの誘導体に対する酵素活性ならびに基質特異性も高く，実用レベルに達していることがわかった。

この新しい，発現系に関する論文は準備中であり作成次第投稿する予定である。

B. 組換え体の休止状態の検討

Pichia pastoris および *Alkaligenes oryzae* を宿主として作成した組換え体は野生型酵素と同等またはそれ以上の活性を示したが，分光学的および磁気的に異なる性質を示した，すなわち，ヒドロキソ基が架橋した複核タイプ３銅(II)特有の 330 nm の肩吸収が弱く，ESR スペクトルのタイプ２銅の超微細分裂が著しく狭くなっていた。しかしながら，これら組換え体を４等量の電子で還元し，酸素によってターンオーバーさせると，天然型酵素と同じスペクトル呈する休止状態に至ることがわかった。このような事実から，組換え体は天然型酵素とは異なるフォームをとって発現していることがわかった。この事実については論文として発表した。

C. タイプ３銅に対する変異体

２つのタイプ３銅に配位する His456 と His458 をそれぞれ，Lys，Asp，Val に変異させたダブルミュータントを作成した。非配位性の Val に変異させた場合は，三核銅部位には銅イオンが入っていなかったが，配位性のアミノ酸である Lys や Asp に変異すると，低いながらも酵素活性が見られた。酵素活性が低下したのは，三核銅部位の酸化還元電位が負電位側へシフトしたか，酸素の結合能の変化もしくは酸素還元が遅くなったからであるが，これらの理由のいずれによるかは特定できなかった。結果は，論文として報告した。

D. タイプ１銅に対する変異体

タイプ１銅は 1Cys2His1Met の配位子セットを有している。これらの配位

残基のうちCysに対する変異とMetに対する変異を行った。まずCysをSerに置換した。得られた変異体のタイプ１銅部位には銅イオンが入っていなかったが，三核銅部位は完全に保持されていた。このミュータントによって，純粋に三核銅部位に由来する分光学的および磁気的データを得ることができた。嫌気条件下，このミュータントを３等量の電子で還元させ酸素と反応させたところ，目的とする寿命の長い酸素還元中間種のスペクトルを得ることが出来た。目下，この中間体のキャラクタリゼーションを進めているところであり，結果がまとまり次第，論文として発表する予定である。

一方，Met を Gln に置換したミュータントも作成した。このミュータントには４つの銅イオンが全て含まれているが，ビリルビンの酸化活性はほぼ完全に失われていた。しかし，フェロオキシダーゼ活性は大変高いことから，タイプ１銅の酸化還元電位の負側へのシフトに起因する挙動を示していると考えられた。酸素との反応によって，野生型酵素や組換え体では観測することの出来ないもう一つの酸素還元種を補足できることが判明したので，目下この中間体に関するデータ取得を行っているところであり，結果がまとまり次第，論文として報告する予定である。

E. 銅結合部位近傍への変異導入

ウルシラッカーゼの反応で三核銅部位の近傍に位置する酸性アミノ酸が酸素還元の際にプロトンソースとなることが予想されたので，アミノ酸配列の相同性から，ビリルビンオキシダーゼの Asp105 が重要と予測し，このアミノ酸残基に変異導入した。この Asp をかさ高さがほぼ同じの Asn に置換したところ，予想だにしなかったことに，三核銅部位に銅イオンが 1 個程度しか入らないことが判明した。この事実は，Asp105 が三核銅部位の近傍に位置し，直接的または間接的に銅イオンの保持に寄与していることを示唆している。そこで，Asn ではなく Glu に置換したところ，三核銅部位は正常に形成されるが酵素活性は,低下していることがわかった。現在，完全に非配位性の Ala ミュータントを作成してさらに確認しているところである。

研 究 の 展 望

ウルシラッカーゼについてはアミノ酸配列を決定し，間もなく活性のある組換え体を異種発現させる段階までこぎつけた。また，ビリルビンオキシダーゼの高発現系を構築することに成功し，酸素還元に反応中間体の検出にも成功した。しかしながら，３年間という期間はあまりにも短く，多くの課題が完全にはまとめることができなかった。このことは，マルチ銅オキシダーゼの基礎および応用研究は大変奥深く，また，広範に対応すべきものであることを示すものである。この３年の間にマルチ銅オキシダーゼを取り巻く研究環境は新しい酵素の登場や実用的用途の拡大によって爆発的に広がりつつある。本研究を終えるにあたり，我々がこれらの問題に対処するために最も適切かつタイムリーなアプローチをおこなっていることを自負できることを確認するとともに，引き続き研究目標とそのための戦略を点検し，本研究をさらに高度に展開することが肝要である。